

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14750

研究課題名（和文）自発的に細胞内へ導入される膜透過性核酸の開発および導入メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of membrane-permeable oligo nucleotide and clarification of the uptake mechanism

研究代表者

平岡 陽花（HIRAOKA, Haruka）

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：70880053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ジスルフィド修飾を施した細胞膜透過性核酸MPONについて、その膜透過のタイムスケールを明らかにし、MPONと特異的に結合し細胞導入を助ける責任タンパク質の候補を質量分析により同定した。また、細胞導入後のMPONが時間経過に伴い核内に移行すると分かったことから、核内で生じるスプライシング異常に起因する筋ジストロフィーの治療への適用可能性を着想し、実際に疾患モデルマウスにおいて一定の効果が見られた。さらに、異なる修飾基を付加した次世代型MPONを開発し、その機能評価を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究室で開発した細胞膜透過性核酸MPONが細胞核内へと移行することが分かり、核内で起こる選択的スプライシングのパターンを高い効率で変化させることがマウスで確かめられたことから、筋ジストロフィーの原因となるスプライシング異常を是正し疾患治療に適用できる可能性が示された。また、MPONの細胞膜透過過程および細胞内動態の観察に基づき利点とさらなる改善点を明確にしたことで、改良型の次世代MPONの開発を大きく進展させた。核酸医薬としての医学的応用は勿論、膜透過による核酸材料の効率的な運搬と供給を可能にするMPONは人工細胞における核酸・タンパク質の機能解析への適用も期待され、学術的意義も高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarified the timescale of membrane permeabilization of MPON, Membrane Permeable OligoNucleotides modified with disulfide units, and identified the candidate responsible protein that specifically binds to MPON and promotes the cell transduction by mass spectrometry. Furthermore, we found that MPON is translocated into the nucleus over time after cell transduction, which led to the idea that MPON could be applied to the treatment of muscular dystrophy caused by splicing abnormalities in the nucleus. Actually, MPON functioned in alteration of splicing pattern in a mouse model of the disease. We also developed improved next-generation MPONs with different modification groups and evaluated their functions.

研究分野：分子生物学

キーワード：膜透過性核酸 ジスルフィド修飾 核酸医薬 筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の本体である DNA 配列に生じた変異は、異常なタンパク質の産生を誘導し様々な疾患を引き起こす。その治療法として、アンチセンス DNA や siRNA などの核酸を生体内に導入することで mRNA の分解を誘導し異常タンパク質の産生を抑制する核酸医薬が注目されている。核酸配列依存的に作用するため、特異性が高く副作用が起こりにくい利点がある一方で、現在汎用されている導入方法として、カチオン性リポソームを利用したリポソーム法 (*Sci. Rep.* 6, 2016) や、膜上の受容体とリガンドの結合を介したコンジュゲート法 (*Nature Biotech.* 35, 2017) が挙げられるが、いずれもエンドサイトーシスによる取り込みを介した手法となっており、エンドソーム小胞からの脱出効率が非常に低く、エンドソーム内に長く留まることで核酸が分解されるため、細胞質へ到達し機能を発揮できる核酸分子が非常に少ないことが核酸医薬としての機能に制限をかけていた。核酸医薬の汎用化のためには、効率的な細胞内導入が可能な核酸設計が重要と考えて化学修飾核酸の開発に取り組み、これまでに我々は、核酸にチオール基を含むジスルフィド修飾ユニットを付加することで、エンドサイトーシスを介さない自発的かつ速やかな細胞内導入が可能となることを見出し、膜透過性核酸 (Membrane Permeable Oligo Nucleotide) の頭文字から MPON と名付けた (図 1; *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 6611, 2019)。細胞膜表面のチオール基をキャッピングすると導入効率が大きく低下したことから、MPON は、細胞膜表面に存在する膜タンパク質とのジスルフィド結合を介して細胞内に導入されると考えられたが、結合相手となる膜タンパク質が明らかになっておらず、MPON の導入メカニズムについては推測の域を出ていなかった。また、導入開始後の細胞内動態についても詳しく調べられておらず、MPON の導入や機能のタイミングを完全には制御できていない点が、今後医薬応用していく上での課題として挙げられた。

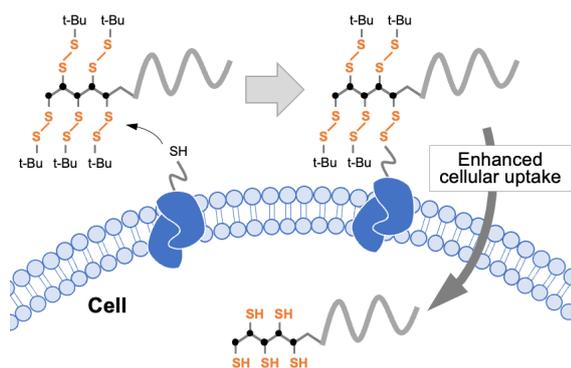


図 1: MPON の細胞内導入

2. 研究の目的

本研究課題では、我々の研究室で新規開発した膜透過性核酸 MPON の膜透過メカニズムおよび細胞内動態の解明を通して、速やかな細胞膜透過および機能制御を可能とする新規修飾核酸の開発につなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) MPON と特異的に結合する膜タンパク質の同定

ビオチン-アビジン間の特異的な共有結合を利用して、MPON と結合して MPON の細胞内導入を担うタンパク質の同定に取り組んだ。具体的には、MPON の 3'末端にデスチオビオチンを付加して HeLa 細胞に添加することで、MPON と結合するタンパク質を間接的にビオチンラベルし、ストレプトアビジンビーズを用いて選択的に回収した (図 2)。その後、回収されたタンパク質を質量分析により同定した。

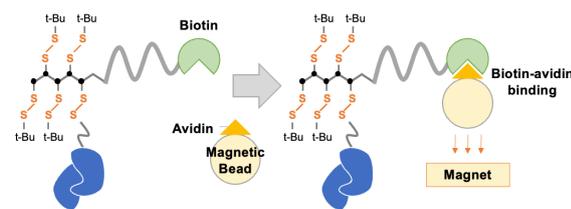


図 2: MPON 結合タンパク質の選択的回収

(2) 膜透過性核酸 MPON の膜透過過程および細胞内動態の観察

アンチセンス DNA の 5'末端にジスルフィド修飾ユニットを付加した MPON の 3'末端に蛍光色素 FAM を付加してヒト培養細胞である HeLa 細胞を含む培養液に添加し、HeLa 細胞への蛍光流入を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞内導入された蛍光ラベル MPON の細胞内局在の変化を観察した。

(3) 次世代 MPON の開発

(2) から明らかになった MPON の特徴を踏まえて、ジスルフィド修飾ユニットの改変による MPON の機能向上に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) MPON と特異的に結合する膜タンパク質の同定

MPON と結合するタンパク質として 165 個のタンパク質が質量分析により同定され、そのうち 13 個が膜タンパク質であった。MPON は膜タンパク質の持つチオール基とジスルフィド結

合を形成すると考えられることから、同定されたタンパク質群の立体構造予測に基づき、タンパク質表面にフリーのチオール基を持つタンパク質をさらに絞り込んだところ、分子輸送に関わるとされる複数のタンパク質が候補として得られた (Hiraoka et al., *ChemBioChem* 22(24), 2021)。これらのタンパク質が MPON の細胞内導入を担っていると考えられ、当該タンパク質の発現量向上を促すことで、MPON による遺伝子抑制効果をより向上させることも期待される。

(2) 膜透過性核酸 MPON の膜透過過程および細胞内動態の観察

蛍光ラベル MPON を添加した HeLa 細胞の観察から、MPON が添加直後に細胞膜に結合し、そこから 5 分程度で細胞内へと徐々に導入されることが分かった (図 3)。これは、MPON が細胞膜上のタンパク質とのジスルフィド結合形成により細胞膜上にアンカーされ、その後細胞内へと導入されるというこれまでの仮説を支持するものである。また、その後の細胞内動態の観察から、細胞内に導入された MPON は、添加後 48-72 時間して細胞核へと移行することが分かり (図 4)、核内で起こる選択的スプライシングの制御への適用性が期待された。そこで、スプライシング異常により機能的なジストロフィンタンパク質を欠失した筋ジストロフィー疾患モデルマウスに対して、スプライシングパターンを変化させ機能的なジストロフィン産生を促すアンチセンス DNA を投与したところ、当該アンチセンス DNA にジスルフィド修飾を付加した MPON を用いた場合に、より効率的なスプライシングパターンの変化が見られた。この結果は、MPON が筋ジストロフィーの治療における有効な手段となり得ることを示すと同時に、細胞質および細胞核内の分子を標的とした幅広い疾患治療に適用しうることを示唆している。以上の結果を論文として報告した (Hiraoka et al., *ChemBioChem* 22(24), 2021)。

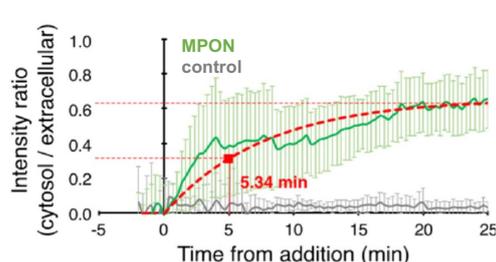


図 3 : MPON 導入のタイムスケール

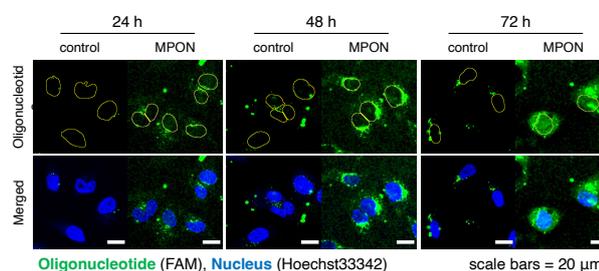


図 4 : MPON の細胞核移行

一方で、核移行に要する時間が 48-72 時間と長いことから、より効果的な核移行を促進するために、トリメチルグアノシン (TMG) キャップ (図 5) を付加した核酸の合成を試みた。TMG キャップは核内スプライシングに関与する snRNA によく見られる 5' キャップ構造であり、これを付加することで核移行を促進するとされる (*Nucleic Acids Research*, 6, 2009)。TMG キャップを付加した核酸をリポフェクションによって導入し、まずは核移行の効率のみの評価を行なったところ、予想に反して、TMG キャップの有無で核移行の効率に差は見られなかった。このとき、安定性向上のために核酸配列全体に 2'-OMe 修飾を付加しており、その影響で TMG キャップの核移行効果が得られなかった可能性も考えられた。核酸配列に導入する化学修飾との組み合わせを今後検討していく必要がある。

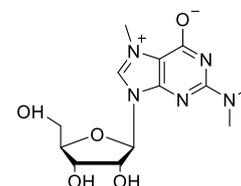


図 5 : TMG キャップ

(3) 次世代 MPON の開発

(2) の細胞内動態の観察の結果、細胞内で局所的に凝集している様子が一部の細胞で見られた。ここで用いた第一世代と呼称する MPON に付加したジスルフィド修飾ユニットは高い疎水性を有しており、それが細胞内での核酸凝集を促している可能性が考えられた。凝集が見られた細胞は一部であったが、凝集によって、見かけの核酸濃度低下に伴う機能低下や細胞への悪影響が起こる可能性が危惧されたことから、さらなる機能向上とリスク軽減のために、疎水性を低下させた修飾基や、細胞内の還元的環境に応答して修飾が外れる脱離型の修飾基などを付加した、新しい膜透過性核酸の開発に取り組んだ。候補として合成したいくつかの修飾核酸について、膜透過性効率および遺伝子抑制効果を評価したところ、機能向上が見られた有望な次世代 MPON が得られつつあり (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 74, 2022; *Chem. Commun.* 59(33), 2023; *Chem. Commun.* 59(77), 2023)、引き続き改良型の合成と評価を進めて順次報告していく。疎水性低下により精製効率の向上や合成工程の簡略化にも成功しており、機能向上に加えて、将来的な医薬展開を視野に入れた際のコスト軽減や大量生産の実現にも寄与している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fangjie Lyu, Takashi Tomita, Naoko Abe, Haruka Hiraoka, Fumitaka Hashiya, Yuko Nakashim, Shiryu Kajihara, Fumiaki Tomoike, Zhaoma Shu, Kazumitsu Onizuka, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe	4. 巻 59(77)
2. 論文標題 Topological capture of mRNA for silencing gene expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11564-11567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CC06189A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshinobu Nakajo, Shinpei Kusaka, Haruka Hiraoka, Kohei Nomura, Noriaki Matsubara, Rintaro Baba, Yuki Yoshida, Kosuke Nakamoto, Masakazu Honma, Hiroaki Iguchi, Takayuki Uchihashi, Hiroshi Abe, Ryotaro Matsuda	4. 巻 59(33)
2. 論文標題 Creation of single molecular conjugates of metal-organic cages and DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical communications	6. 最初と最後の頁 4974-4977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC00460K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fangjie Lyu, Seongjin An, Yoshiaki Kobayashi, Kohei Nomura, Rintaro Baba, Naoko Abe, Haruka Hiraoka, Fumitaka Hashiya, Zhaoma Shu, Kumiko Ui-Tei, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe	4. 巻 74
2. 論文標題 A 2'-modified uridine analog, 2'-O-(methylthiomethoxy)methyl uridine, for siRNA applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Haruka Hiraoka, Zhaoma Shu, Bao Tri Le, Keiko Masuda, Kosuke Nakamoto, Lyu Fangjie, Naoko Abe, Fumitaka Hashiya, Yasuaki Kimura, Yoshihiro Shimizu, Rakesh N. Veedu, Hiroshi Abe	4. 巻 22(24)
2. 論文標題 Antisense Oligonucleotide Modified with Disulfide Units Induces Efficient Exon Skipping in mdx Myotubes through Enhanced Membrane Permeability and Nucleus Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3437-3442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横江 隼人, Lyu Fangjie, 秤谷 隼世, 平岡 陽花, Li Zhenmin, 松原 徳明, Soo Yonghao, 橋谷 文貴, 阿部 奈保子, Shu Zhaoma, 中本航介, 木村 康明, 阿部 洋
2. 発表標題 核酸医薬への応用を志向した新規細胞膜透過性核酸の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平岡陽花, Zhaoma Shu, Bao Tri Le, 益田恵子, 中本航介, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, Rakesh N. Veedu, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 膜透過性核酸MPONの核移行によるエキソンスキッピングの促進
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lyu Fangjie, Hayase Hakariya, Haruka Hiraoka, Li Zhenmin, Noriaki Matsubara, Satoshi Uchida, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutics
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原 徳明, 平岡 陽花, 秤谷 隼世, Zhenmin Li, Lyu Fangjie, 内田 智士, 木村 康明, 阿部 洋
2. 発表標題 ジスルフィド結合を利用した細胞膜透過性オリゴ核酸の開発
3. 学会等名 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山里美, 平岡陽花, 中嶋裕子, 阿部奈保子, Zhenmin Li, 加藤駿一, 吉田祐希, 加瀬光希弥, 阿部洋
2. 発表標題 化学修飾mRNAの細胞膜透過性及び翻訳能の検討
3. 学会等名 日本化学会 第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lyu Fangjie, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutic
3. 学会等名 第15回 ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 自発的かつ超高速に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原徳明, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 ジスルフィド結合を利用した細胞膜透過性オリゴ核酸の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 阿部洋
2. 発表標題 自発的かつ超高速に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 第37回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山里美, 平岡陽花, 阿部奈保子, 中嶋裕子, 吉田祐希, 加瀬光希弥, 野村浩平, 阿部洋
2. 発表標題 化学修飾mRNAの合成及びその細胞膜透過性と翻訳能の検討
3. 学会等名 第37回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruka Hiraoka, Shu Zhaoma, Saki Kawaguchi, Kosuke Nakamoto, Keiko Masuda, Kotaro Hayashi, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Yoshihiro Shimizu, Satoshi Uchida, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Membrane permeable oligonucleotide (MPON) induce the exon skipping against pre-mRNA by the enhanced transfer of antisense DNA to nucleus
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡陽花, Zhaoma Shu, Bao Tri Le, 益田恵子, 中本航介, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, Rakesh N. Veedu, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 膜透過性核酸MPONは効率的に核移行しエキソンスキッピングを促進する
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山里美, 平岡陽花, 中嶋裕子, 阿部奈保子, Zhenmin Li, 加藤駿一, 吉田祐希, 加瀬光希弥, 阿部洋
2. 発表標題 化学修飾mRNAの合成及びその細胞膜透過性と翻訳能の検討
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秤谷隼世, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 松原徳明, Lyu Fangjie, 稲垣雅人, Zhenmin Li, Steve Soo, 木村康明, 阿部洋
2. 発表標題 核酸医薬送達プラットフォームとしての細胞膜直接透過型オリゴ核酸
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 平岡陽花, 阿部洋	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 3
3. 書名 総合診療コラム「mRNAワクチンの現在と未来」	

1. 著者名 最先端ナノライフシステム研究編集委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善プラネット株式会社	5. 総ページ数 215
3. 書名 最先端ナノライフシステム研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	Murdoch University			